

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
ÖKOLOOGIA- JA MAATEADUSTE INSTITUUT

Aro Nurkse

**PEREMEHESPETSIIFILISUS EKTOMÜKORIISASEENTEL, SEALHULGAS
PEREKONDADES *HYMENOGASTER* JA *ELAPHOMYCES***

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Leho Tedersoo, PhD

Tartu 2016

Sisukord

1. Infoleht	3
2. Sissejuhatus	4
3. Ülevaade ektomükoriisaseentest ja nende peremehespetsiifilisusest	6
3.1 Areng ja evolutsioon	6
3.2 Uurimise ajalugu	6
3.3 Morfoloogia ja funktsioon	7
3.4 Levik ja kooslus	8
3.5 Peremehespetsiifilisus	9
4. Materjal ja meetod	10
4.1 Proovide kogumine	10
4.2 Molekulaarsed meetodid	10
4.3 Statistiline analüüs	12
5. Tulemused	12
6. Arutelu	13
7. Kokkuvõte	16
8. Summary	17
9. Tänuavaldused	18
10. Kasutatud kirjandus	18
11. Lisad	27

1. Infoleht

Peremehespetsiifilisus ektomükoriisaseentel, sealhulgas perekondades *Hymenogaster* ja *Elaphomyces*. Käesoleva töö eesmärgiks oli anda ülevaade ektomükoriisa seente peremehespetsiifilisusest ja hinnata spetsiifilisust seeneperekondades *Hymenogaster* ja *Elaphomyces*. Statistiliste meetodite alusel sai välja tuua liigid *Hymenogaster citrinus*, *H. griseus*, *H. arenarius*, *Elaphomyces asperulus* ja *E. papillatus*, mis kõik omasid teatud eelistust peremeeste perekondade suhtes. Ektomükoriisete seente peremehespetsiifilisusel on oluline roll seente elus, mõjutades selle erinevaid aspekte. Peremehespetsiifilisus ja selle mehhanismid on liikide tasemel veel suuresti uurimata, kuid oletatakse, et see võib olla kitsam, kui varem arvatud. Molekulaarsete meetodite ja uute tehnikate kasutuselevõtt on märkimisväärselt lihtsustanud liikide ja nende peremeeste tuvastamisprotsessi ning andnud detailsemaid andmeid ektomükoriisete seente liikide, peremeestaimede ja geograafilise leviku kohta. Ektomükoriisete seente leviku ja mõju tõttu erinevate metsade ökosüsteemides on nende uurimine keskkonnale ja seal toimuvatele protsessidele väga oluline. Märksõnad: ektomükoriisaseened, peremehespetsiifilisus, koosluste struktuur, *Hymenogaster*, *Elaphomyces*

Host specificity in ectomycorrhizal fungi and in genera *Hymenogaster* and *Elaphomyces*. The aim of this study was to give an overview of host specificity in ectomycorrhizal fungi and to evaluate the host specificity in genera *Hymenogaster* and *Elaphomyces*. Species *Hymenogaster citrinus*, *H. griseus*, *H. arenarius*, *Elaphomyces asperulus* and *E. papillatus* had a certain preference towards different host genera. Host specificity of ectomycorrhizal fungi has an essential role in the lives of fungi, as it affects different aspects of it. Host specificity and its mechanisms have not been thoroughly studied amongst species level, but it is assumed to be more narrow than thought before. New molecular methods and techniques have remarkably simplified and made more accurate the identification of species of fungi and their hosts. Research into ectomycorrhizal fungi is important to environment and its processes because of its distribution and impact in different kinds of forest ecosystems. Key words: ectomycorrhizal fungi, host specificity, community structure, *Hymenogaster*, *Elaphomyces*

2. Sissejuhatus

Seened on eukarüootsed mikroorganismid, kes omavad ökoloogiliselt olulist rolli erinevate taimede ja loomade lagundajatena, mutualistidena ja patogeenidena. Samuti osalevad nad metsapinnase süsinikuringes ja vahendavad taimedele toitaineid. Kirjeldatud seeneliikide arv ulatub umbkaudu 100000 liigini, kuid oletatakse, et tegelik globaalne seente elurikkuse määr võib olla 0,8 kuni 5,1 miljonit liiki (Blackwell, 2011).

Mükoriissetel seentel on oluline roll maismaataimede mineraalses toitumises, kuid nende levikut, mitmekesisust ja koosluse struktuuri (eriti troopiliste seente juures) ning faktoreid, mis neid mõjutavad on vähe uuritud (Bahram *et al.*, 2011). Ligilähedaselt 95% maailmas eksisteerivatest taimeliikidest kuuluvad perekondadesse, kes on mükoriissed ja saavad kas osa või kõik oma toitainetest sümbioosist seentega (Smith ja Read, 2008; Pringle *et al.*, 2009). Mükoriisad on tavaliselt mutualistlikud ühendused seente ja taimejuurte vahel, mis vahendavad eluks ja kasvuks vajalikke toitaineid (Brundrett, 2004). Maismaataimed omastavadki enamiku toitainetest mükoriisade kaudu (Smith ja Read, 2008). Enamasti toimub taimedelt seentele süsiniku transport ning seentelt taimedele mineraalainete (nt. lämmastik ja fosfor) transport (Smith ja Read, 2008). Parem toitainetega varustus aitab seega kaasa rikkamale ja tihedamale taimeelustiku võrgustikule antud keskkonnas.

Ektomükoriisa on mutualistlik sümbioos üldiselt puittaimede, kuid ka teatud rohttaimede vahel ning seda peetakse metsaökosüsteemides tähtsaimaks toitaineringe ja süsinikuringe kujundajaks (Anderson ja Cairney, 2007; Smith ja Read, 2008). Peamisteks ektomükoriisasid moodustavateks seente hõimkondadeks on *Basidiomycota* (kandseened) ja *Ascomycota* (kottseened) (Finlay, 2008). Tänapäevaks on teada, et 7950 seeneliigil on võime moodustada ektomükoriisat, kuid tegelikult ektomükoriisasid moodustavate seeneliikide arvuks peetakse koguni 20000-25000 (Comandini, Rinaldi ja Kuyper, 2012). Ektomükoriisses sümbioosis pakuvad seened peremeestaimedele mitmeid hüvesid, millede hulka kuuluvad näiteks suurenenud vee ja toitainete omastamise võimalus (Smith ja Read, 2008). Põhiliselt kuuluvad ektomükoriisaseente peremeestaimed *Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Cupressaceae*, *Gnetaceae*, *Polygonaceae*, *Nyctaginaceae*, *Myrtaceae*, *Salicaceae*, *Fabaceae*, *Fagales* ja *Malvales* sugukondadesse (Wang ja Qiu, 2006), aga leidub ka rohtseid ektomükoriisseid taimeperekondi, nagu näiteks *Dryas* ja *Helianthemum* (Smith ja Read, 2008). Ektomükoriisa sümbiondid

moodustavad kuni 39% mikrobiaalsest biomassist (Högberg *et al.*, 2010) ja 10–35% boreaalsete metsade mullahingamisest (Smith ja Read, 2008). Ektomükoriisaseente kõrge levik metsade pinnases muudab oluliseks nende ökoloogia mõistmise selleks, et neid paremini hallata ja kaitsta (Tedersoo ja Smith, 2013).

Ektomükoriisaseene peremehespetsiifilisuse määr mõjutab tugevalt seene elumust, levimist ja uutesse ökosüsteemidesse liikumist (Courty *et al.*, 2010). Osa ektomükoriisaseentest suudavad sümbioosi moodustada kõikide ektomükoriisat moodustavate peremeestega, teised on aga spetsialiseerunud ainult üksikule taimeperekonnale (Courty *et al.*, 2010). Kuigi parasvöötme ökosüsteemides mõjutab peremeestaim tugevalt enda ümber olevat ektomükoriisaseteseente koosluste struktuuri (Ishida, Nara ja Hogetsu, 2007; Morris *et al.*, 2009; Tedersoo *et al.*, 2008), esineb ainult vähestel dominantsetel seeneliikidel olulist peremehespetsiifilisust.

Käesolevas töös keskendun perekondadele *Hymenogaster* (maapähkel) ja *Elaphomyces* (hirvepähkel). *Hymenogaster* perekond kuulub *Basidiomycota* (kandseened) hõimkonda, *Hymenomycetes* (eoslavaseened) klassi, *Hymenogasterales* (maamügaralaadsed) seltsi ja *Hymenogasteraceae* (maamügaralised) sugukonda. *Elaphomyces* kuulub *Ascomycota* (kottseened) hõimkonda, *Elaphomycetales* (hirvepähklilaadsed) seltsi ja *Elaphomycetaceae* (Hirvepähklilised) sugukonda. Perekonnas *Hymenogaster* on kirjeldatud umbes 170 liiki põhjapoolkeralt ja lõunapoolkeralt (Stielow *et al.*, 2011). *Elaphomyces* on levinud põhjapoolkeral, Austraalias, Uus-Meremaal, Uus-Guineal ning ka sealsetel ümberkaudsetel saartel (Castellano, Trappe ja Vernes, 2011). *Elaphomyces* perekonnas on hetke seisuga kindlalt ja selgelt eristatavaid liike 55 (Castellano, Beever ja Trappe, 2012).

Töö eesmärgiks on anda ülevaade ektomükoriisaseente peremehespetsiifilisusest ning määrata statistiliste meetodite abil, kas perekondade *Elaphomyces* ja *Hymenogaster* Eesti liikidel esineb märkimisväärset liigispetsiifilisust.

3. Ülevaade ektomükoriisaseentest ja nende peremehespetsiifilisusest

3.1 Areng ja evolutsioon

Molekulaarsed fülogeneetilised uuringud näitavad, et *Basidiomycota*, *Ascomycota* ja *Zygomycota* hõimkondades on eraldi iseseisvalt ektomükoriisne sümbioos välja arenenud 78-82 korral, mis moodustavad kokku umbes 251-256 perekonda (Tedersoo ja Smith, 2013). Esimesed fossiilsed näited ektomükoriisete seente kohta on leitud peremeestaimede juurte fossiilidelt, mis pärinevad Eotseeni ajastust 55-34 MAT (LePage *et al.*, 1997). Fülogeneetiline analüüs näitab, et mitmed ektomükoriisete seente põhiliigid ja perekonnad arenesid kõige tõenäolisemalt Hilis-Juura ja Varajases Kriidi ajastus 150-99 miljonit aastat tagasi (Berbee ja Taylor, 2010).

3.2 Uurimise ajalugu

Esimene perekonna *Elaphomyces* mainimine oli *Tubera Cervina* nime all (de L'Obel (1591). Perekonnanime *Elaphomyces* soovitas esimesena kasutusele võtta Nees von Esenbeck (1820) ja seda kinnitas Fries aastal 1825. Uusi liike on mitmete aastate jooksul lisanud mitmed autorid ja siiani ainsa ulatusliku uurimistöö tegi Dodge (1929). (viidatud Castellano, Trappe ja Vernes (2011) kaudu).

Mükoriisse seene esmasel tuvastamisel on headeks indikaatoriteks selle morfoloogilised tunnused, mis aitavad teostada määramist, kuid sellegipoolest ei võimalda alati seent tuvastada liigitasemel sajabrotsendilise täpsusega (Kagan-Zur *et al.*, 2001). 1990-ndatel aastatel võimaldas uute ja tõhusamate molekulaarsete tööriistade ning analüüsiprotseduuride kasutuselevõtt palju parema ektomükoriisaseente identifitseerimist *in situ* (Gardes *et al.*, 1991; Horton ja Bruns, 2001; Egger, 1995). Kaasaegsemate analüüsiprotseduuride tulek võimaldas määrata mitmete levinud, kuid mitte veel tuvastatud ektomükoriisete seente taksonoomilist kuuluvust (Egger, 1996; Kõljalg *et al.*, 2000; 2002; Vrålstad, Fossheim ja Schumacher, 2000). Uute tehnikate ja protseduuriliste valikute seas on erinevad eksperimentaalsed sünteesiuuringud, anatoomilisi ja molekulaarseid tehnikaid kombineerivad väliuuringud ning stabiilse lämmastiku ja süsiniku isotoopide signatuurid ja fülogeneetilised analüüsid (Tedersoo, May ja Smith, 2010). Molekulaarsed tehnoloogiad on osutunud vägagi efektiivseks seeneliikide määramisel mullast (Suz, Martin ja Colinas, 2006; Štursová *et al.*, 2012). DNA järjestuste kiiresti kasvav andmestik avalikes andmestikes koos hiljuti arendatud DNA järjestuste annoteerimise töölauaga (näiteks

PlutoF: Abarenkov *et al.*, 2010) pakuvad hindamatuid metaandmeid peremeestaimede, DNA päritolu ja proovide geograafilise asukoha kohta (Tedersoo *et al.*, 2011).

3.3 Morfoloogia ja funktsioon

Suurem osa ektomükoriisestest seentest paljunevad seksuaalselt moodustades makroskoopilisi viljakehasid, erinedes selle poolest seentest, mis moodustavad arboskulaarset ja erikoidset mükoriisat. Ektomükoriisa peamisteks tunnusteks on Hartigi võrgustik, taimejuure ümber olev seenmantel ja ekstramatrikaalne mütseel. Ekstramatrikaalse mütseeli ja seenmantli väljaarenemises võib olla seentel märkimisväärsed erinevusi. Hartigi võrgustik koosneb seeneniitidest, mis on tunginud juurerakkude vahele ning võimaldavad sellega toitainete ja signaalmolekulide vahetust sümbiontide vahel. Enamuse ektomükoriisete seente seeneniidistik on võimeline ka taimeraku kesta läbistama, kui sümbioos pole tasakaalus või juur on vananenud, muutes seene käitumise patogeenseks. Teiseks iseloomulikuks struktuuriks on seenmantel, mis koosneb tihedalt põimunud seeneniitidest ja ümbritseb juurt, millega reguleerib taimeni jõudvate mineraalainete hulka (Smith ja Read, 2008). Seenmantli eri kihtide rakkude kuju ja asetuse erinevus võimaldavad ektomükoriisseid seeni määrata perekonna tasemel ning eristada ka mitmeid liike. Kolmandaks struktuuriks on juureväline mütseel, mis koosneb üksikutest seeneniitidest, mis kasvavad juurest eemale. Selle struktuuri ülesandeks on toitainete vahetus mullaga, hõlmates võimalikult suurt ruumala. Osaliselt on mõnedel ektomükoriisestel seentel nende saprotroofse päritolu tõttu säilinud ka võime lagundada ensüümidega vähesel määral tselluloosi ja ligniini. (Smith ja Read, 2008).

Ökosüsteemides, kus domineerivad ektomükoriissed suhted, on küllaltki levinud lämmastiku madal kättesaadavus ja selle piiratud omastamise mõju taimekasvule (Smith ja Read, 2008). Lämmastik on seentele kättesaadav nii anorgaanilisel kui orgaanilisel kujul. Anorgaanilisest lämmastikust on kõige kergemini omastatavad ammoonium (NH_4^+) ja nitraatlämmastik (NO_3^-) (He, Critchley ja Bledsoe, 2003). Orgaanilist lämmastikku suudavad ektomükoriissed seened omastada spetsiifiliste ensüümide abiga aminohapetest ja oligopeptiididest (Smith ja Read, 2008).

3.4 Levik ja kooslus

Molekulaarse identifikatsiooni uuringute areng on kasvatanud inimkonna teadmisi ektomükoriisseteseente kogukondadest ning sellest tulenevalt on leitud mitmeid uusi seoseid taimede ja seente vahel (Taylor, 2008; Tedersoo *et al.*, 2010a). Uute meetoditega tehakse määrangud mükoriisadest, mis annab võimaluse määrata samaaegselt molekulaarsete meetoditega ka peremeestaime. Hiljuti on teostatud erinevaid uuringuid ektomükoriisete seente elurikkuse kohta näiteks Aafrika (Tedersoo *et al.*, 2007, 2010b, 2011; Diédhiou *et al.*, 2010; Suvi *et al.*, 2010), Kagu-Aasia troopiliste vihmametsade (Sirikantaramas *et al.*, 2003; Cheevadhanarak ja Ratchadawong, 2006; Peay, Garbelotto ja Bruns, 2010), ja Lõuna-Ameerika keskkondades (Tedersoo *et al.*, 2010c; Smith *et al.*, 2011).

Ektomükoriisete seente kooslust mõjutavad mitmed abiootilised ja biootilised tegurid. Pinnase toitained (Toljander *et al.*, 2006; Cox *et al.*, 2010; Suz *et al.*, 2014), pH tase (Baar ja ter Braak, 1996; Talbot *et al.*, 2013), pinnase temperatuur ja niiskus (Claridge, Cork ja Trappe, 2000a; 2000b; Jones, Durall ja Cairney, 2003), reostus (Parrent, Morris ja Vilgalys, 2006; Andrew ja Lilleskov, 2009) ning erinevad aastaajad ja isegi kuud (Courty *et al.*, 2008) kuuluvad abiootiliste tegurite hulka, mis mõjutavad antud seente kogukonna koosseisu. Biootilisteks teguriteks on näiteks mitmed erinevad peremeestaimed (Kernaghan *et al.*, 2003; Smith ja Read 2008; Morris *et al.*, 2009; Ishida, Nara ja Hogetsu, 2007; Tedersoo *et al.*, 2008), leviku piirang (Peay, Garbelotto ja Bruns, 2010) ja juure pinnal toimuva kolonisatsiooni ajastus ning konkurents (Kennedy, Peay ja Bruns, 2009; Kennedy, 2010).

Vastuolus tavalise laiuskraadilise mustriaga, mille puhul liigirikkus ekvaatori poole liikudes kasvab, väheneb ektomükoriisseteseente liigirikkus parasvöötme ökosüsteemidest troopilistesse ökosüsteemidesse üleminekul (Tedersoo ja Nara, 2010). See võib olla põhjustatud erinevatest proovide võtmise tehnikatest ja molekulaarsetest protseduuridest, mis võimendavad vea komponenti statistilises võrdluses. Boreaalsetes ja parasvöötme metsade ökosüsteemides on liigirikkuse uurimisel keskendutud põhiliselt majandusliku tähtsusega peremeestaimedele, nagu harilik mänd (*Pinus sylvestris*), harilik kuusk (*Picea abies*), tamm (*Quercus spp.*) ja harilik pöök (*Fagus sylvatica*). Vastavates ökosüsteemides läbi viidud meta-analüüs näitas, et kõiki neid puuliike võib koloniseerida kokkuvõtlikult 160-226 erinevat ektomükoriisete seente liiki (De Roman, Claveria ja De Miguel, 2005).

3.5 Peremehespetsiifilisus

Ektomükoriised seened on seotud taimedega mitmetest sugukondadest, mille hulka kuuluvad *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Caesalpiniaceae* ja *Pinaceae* (Bruns, Bidartondo ja Taylor, 2002; Sato, Yumoto ja Murakami, 2007; Tedersoo *et al.*, 2008; Tedersoo, May ja Smith, 2010a). Ektomükoriisete seente seas võib suuremal osal liikidest lugeda peremehespetsiifilisust madalaks, sest peaaegu kõik peremeestaimed on seotud paljude kaugelt suguluses olevate seenteliikidega (Smith ja Read, 2008). Mida väiksem on seene peremehespetsiifilisus, seda rohkemate taimeliikidega on võimalik oma võrgustikku moodustada ja samuti on ka peremeestaimedel võimalik kasutada võimalikult paljude erinevate seeneliikide omadusi (Smith ja Read, 2008). Globaalsel skaalal on metaanalüüsid viidanud aga sellele, et erinevad taimeperekonnad (nagu *Fagaceae* ja *Betulaceae*) seovad ennast kindlate ektomükoriisete kooslustega (Tedersoo *et al.*, 2012). Kohalikul skaalal seevastu seovad ektomükoriissed seened ennast erinevate peremeestaimedega (Bruns, Bidartondo ja Taylor, 2002; Ishida, Nara ja Hogetsu, 2007) ning näitavad eelistusi rohkem kindlate peremeestaimede perekondade poole, kui spetsiifilise peremeestaime suhtes (Dickie ja FitzJohn, 2007). Looduslikest ektomükoriisete seente kooslustest kogutud juuretippude analüüsid näitavad, et enamus taimedest on siiski koloniseeritud seeneliikide poolt, kes moodustavad mükoriisat samaaegselt erinevate taimeliikidega (Ishida, Nara ja Hogetsu, 2007; Van der Heijden ja Horton, 2009).

Juurtega seotud seente ja nende peremeestaimede koosluste struktuuride ning nende vastastikuse mõju mõistmisel on võtmetähtsusega partnerite eelistus või spetsiifilisus sümbiontsetes suhetes (Toju *et al.*, 2013). Toju kolleegidega (2013) leidsid tamme poolt domineerivas Jaapani metsas, et sugukonda *Russulaceae* kuuluva *Lactarius* perekonna liikmed näitasid spetsiifilisust *Quercus* perekonna liikide vastu, kuid mitmed teised *Russulaceae* seeneliigid tuvastati laiemas peremeesteringis ning isegi taimedelt, mis ei kuulugi ektomükoriisete taimede hulka (nagu *Lyonia* ja *Ilex*). Need leiud viitavad seente spetsiifilisuse variatsioonile ka sama fülogeneetilise grupi sees (Toju *et al.*, 2013). Sama perekonna või sugukonna ektomükoriisestel seentel võib esineda peremehespetsiifilisus nii peremehe sugukonna, perekonna, kui ka liigi tasemel (Ishida, Nara ja Hogetsu, 2007; Tedersoo *et al.*, 2008; Toju *et al.*, 2013).

Erinevalt paljudest teistest ektomükoriisataimedest on perekond *Alnus* sümbioosis ektomükoriisaseente ja lämmastikku siduvate *Frankia* bakteritega (Walker *et al.*, 2014). Perekonnaga *Alnus* seotud ektomükoriisaseente kooslus on erakordselt liigivaene ja kitsa peremehespetsiifilisusega (Walker *et al.*, 2014). Seda mustrit on selgelt näidatud nii kohalikul, regionaalsel, kui ka globaalsel tasemel (Tedersoo *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2011; Põlme *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013). Perekonna *Alnus* ebatavalises liigivaesuses ja peremehespetsiifilisuses võib olla suur roll suuremal fosfori omastamise võimekusel, mis puudub *Frankia* bakteritega mittesümbiontsetel ektomükoriisataimedel. Lisaks võib olla tähtis ka võime kasvada madalamal pH tasemel ja kõrgemate nitraadi kontsentratsioonide juures. (Walker *et al.*, 2014).

4. Materjalid ja meetod

4.1 Proovide kogumine

Käesolevas töös analüüsitavaid proove koguti kahel erineval kujul - viljakehadest ning mükoriisadest. Kasutusel olevad proovid koguti mitme aasta vältel peamiselt suvekuudel (kuni aastani 2015, täpsemalt maist septembrini). Proovide kogumises osalesid Leho Tedersoo, Eveli Otsing, Alessandro Saitta, Mohammad Bahram, Kaarin Parts, Ivika Ostonen ja Marit Mett. Proovid on kogutud Eesti ja Põhja-Läti metsadest. Perekondade *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Betula*, *Populus*, *Quercus*, *Alnus*, *Fagus*, *Salix*, *Tilia*, *Betula* juured ja lähipiirkonnad, kaasa arvatud nende perekondade erinevad kombinatsioonid olid asukohad, kust käesoleva töö analüüsis osalevad proovid koguti. Tavapärase meetod, kuidas viljakehade proovid saadi, oli puude lähiümbruse pinnase üleskaevamine ning need kohad märgiti Tartu Ülikooli fungaariumi (TU) tunnusnumbritega algusega 110, 113 ja 116. TU kollektsioonide proove, mis algasid tunnusnumbriga 124, aitas leida spetsiaalselt trühvlite otsimiseks väljaõpetatud koer. Mükoriisaproovid koguti samuti lähiümbruse pinnase üleskaevamise teel ning proovipinnase suuruseks oli 15 x 15 x 5 cm ala. Seejärel vaadeldi eemaldatud mulda binokulaariga ja määrati morfofüütide esindajad. Selle töö tegid samuti ülalmainitud teadlased ja kraadiõppurid.

4.2 Molekulaarsed meetodid

Viljakehadest ja mükoriisade proovidest eraldati DNA, mida kasutati edasistes analüüsides. Viljakehadest eraldati genoomne DNA lüüsipuhvril (0.8 M TrisHCl, 0.2 M

(NH₄)₂SO₄, 0.2% w/v Tween-20; Solis BioDyne, Tartu, Estonia) kasutades proteinaas K meetodit (100 µl lüüsipuhvrit ja 2.5 µl proteinaas K; inkubatsioon 24 tundi 56°C kraadi juures ja 15 minutit 98°C kraadi juures) (Anslan ja Tedersoo, 2015). Mükoriisade puhul puhastati juuretipud ja eristati ektomükoriisa morfotüübid taimeliikide kaupa. Seejärel kasutati väikest osa juuretipust DNA eraldamiseks. Eraldamiseks kasutati Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR kitti (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), järgides tootja-poolseid juhatusi (Tedersoo *et al.*, 2014).

PCR viidi läbi 25 µl lahuses, mis sisaldas 0.5 µl igat primerit (100 mM), 5 µl PCR segu „FirePol Mastermix“ (sisaldab 10 mM MgCl₂, Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 1 µl 10x lahjendatud märklaud DNA-d ja steriliseeritud destilleeritud vett. Liikide tuvastamiseks amplifitseeriti ja sekveneeriti regioone ITS1 (200 bp), 5.8S (151 bp), ITS2 (200 bp) ning LSU D1/D2 ribosomaalsest DNA-st kasutades mitmeid erinevaid praimerite kombinatsioone. ITS ja LSU regioonide amplifitseerimiseks oli PCR-programmiks 15 minutit 95°C juures, 35 30-sekundilist tsüklit 95°C juures, 30 sekundit 55°C juures, 1 minut 72°C juures ja 10 minutit 72°C juures. Amplifikatsiooni õnnestumist kontrolliti elektroforeesi teel 1% agarosi geelil. PCR-i produktid puhastati kasutades Exo-SAP ensüüme (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Ensüümidega puhastamisel eemaldati primerid ja desoksüribonukleotiidid, mis olid analüüsil jäänud kasutamata. Reaktsioonisegu inkubeeriti termotsükleris 45 minutit 37°C juures ja seejärel inaktiveeriti ensüümid 15 minuti jooksul 85°C juures. Puhastatud PCR produktid saadeti DNA-järjestuse määramiseks kasutades PCR praimereid firmasse Macrogen Inc (Amsterdam, The Netherlands).

Sekveneerimisel saadud kromatogrammide kontroll ning töötlemine toimus programmis Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA). Järjestuste kontrollimiseks ja analüüsimiseks koondati järjestused kontiigideks, valides identsuse määraks 85%. Kromatogrammide kontrollil kõrvaldati ka sekveneerimisel tehtud vead (kehva signaali puhul nukleotiidide vale lugemine), mis järjestuse lugemisel tekkisid. Molekulaarse analüüsi ja DNA järjestuste parandamise viisid läbi laborandid, kraadiõppurid ja Leho Tedersoo (PhD).

DNA järjestuste võrdlemiseks ja määramiseks kasutati programmi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) ja andmebaasi GenBank (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*). Parimate vastete leidmisel oli oluline järjestuste kattuvus ning kvaliteet.

4.3 Statistiline analüüs

Seeneliikide peremehespetsiifilisust hinnati taimede perekonna tasemel. Selleks kasutati alasid, millel oli üksainus peremeespuu või perekond ning kõik teised eemaldati. α -väärtuse leidmiseks kasutati Fisheri täpset testi. Töö lähtus standardiks oleva olulisuse nivoo määrast ($\alpha < 0.05$).

5. Tulemused

Paljud proovid olid kogutud aladelt, millel oli mitu erinevat peremeestaime. Mitme peremeestaimega pole aga spetsiifilisust võimalik määrata ja need alad tuli eemaldada valimist, jättes alles ainult alad, millel oli üks spetsiifiline peremees-puu.

Sekveneerimisel saadud järjestuste põhjal leidsin andmebaasist spetsiifilised määrangud, millele järjestused vastasid. Määramise tulemusel eristusid 14 perekonna *Hymenogaster* liiki ja 7 perekonna *Elaphomyces* liiki. Spetsiifilise liigivaste puudumisel või ebamäärasusel sai aga omistatud liigile number. Nendest liikidest sai statistilistes meetodites kasutada 9 *Hymenogaster* liiki ja 5 *Elaphomyces* liiki, ülejäänud liike oli leitud ühelt alalt.

Hymenogaster perekonna liikide proove ühelt kindlalt peremeestaimele leiti kokku 68 ja need koguti 59 erinevalt alalt (vt. tabel 1). Puude perekonnad, millelt seeni leiti olid *Salix*, *Quercus*, *Tilia*, *Corylus*, *Fagus*, *Populus*. Andmebaasist GenBank oli võimalik identifitseerida 9 liiki, milleks olid *Hymenogaster intermedius*, *Hymenogaster citrinus*, *Hymenogaster huthii*, *Hymenogaster megasporus*, *Hymenogaster griseus*, *Hymenogaster tener*, *Hymenogaster arenarius*, *Hymenogaster vulgaris*. Ülejäänud liike ei saanud määrata ning neile kõigile omistati spetsiifiline number. Kõige rohkematel aladel esinenud liikideks olid *H. griseus* ja *H. arenarius*. Nimetute liikide nr. 2, nr. 3, nr. 4 ja nr. 5 proovid leiti eranditult ainult perekonna *Salix* perekonna puudel. Alla olulisuse tõenäosuse ($p < 0,05$) jäid liigid *H. citrinus* ($P = 0,022$), *H. griseus* ($P = 0,007$) ja *H. arenarius* ($P = 0,002$) (vt. tabel 2). See tähendab, et nendel liikidel saab oletada

teatud liigispetsiifilisust. Liiki *H. citrinus* leiti kõige rohkem perekonna *Quercus* aladelt. Liiki *H. griseus* leiti kõige rohkem perekonna *Salix* aladelt. Liiki *H. arenarius* leiti kõige rohkem perekonna *Tilia* aladelt. Nendel liikidel võib täheldada teatud tasemel spetsiifilisust vastavate peremeespuude perekondadele.

Elaphomyces perekonna liikide proove leiti ühelt kindlalt peremeestaimelt kokku 44 ning proovid olid kogutud sealhulgas 24 erinevalt alalt (vt. tabel 3). Seenit leiti puuperekondade *Picea*, *Pinus* ja *Populus* aladelt. Andmebaasi abil sai identifitseerida kokku 6 liiki: *Elaphomyces asperulus*, *Elaphomyces muricatus*, *Elaphomyces sp. 7381.2*, *Elaphomyces papillatus* ja liigid *Elaphomyces sp. 1 EL-2015* ning *Elaphomyces sp. 2 EL-2015*, mida ei saanud paraku statistilistes protseduurides kasutada liiga väikse alade arvu tõttu. Liiki *Elaphomyces* nr.1 ei õnnestunud spetsiifiliselt määrata, kuna andmebaasis leidis liiga palju erinevaid määranguid. Liiki *Elaphomyces asperulus* leidis kõige rohkem erinevatel aladel. *Elaphomyces* perekonna puhul jäid alla olulisuse tõenäosuse vaid liigid *E. asperulus* ($P = 0,019$) ja *E. papillatus* ($P = 0,024$), teiste puhul selliseid tulemusi ei ilmnunud (vt. Tabel 4). Tulemustest lähtuvalt ei saa ka nendele määrata perekonnaspetsiifilisust. Liiki *E. asperulus* leidis kõige enam okaspuu perekondade *Picea* ja *Pinus* aladel, millest võib järeldada spetsiifilisust just nendele perekondadele ja liiki *E. papillatus* leidis ainult *Populus* perekonna aladel, viidates sellega tugevale spetsiifilisusele.

6. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli anda ülevaade ektomükoriisaseente peremehespetsiifilisusest ja hinnata spetsiifilisust perekondades *Elaphomyces* ja *Hymenogaster*. Statistiliste meetodite abil uuriti kas *Elaphomyces* ja *Hymenogaster* perekondade liikide seas esineb eelistust peremeespuude perekondade tasemel.

Algsest liikide valimist tuli eemaldada proovid, millel polnud kogumise ajal kindlaks tehtud spetsiifilist peremeestaime. See vähendas valimit märkimisväärselt, mistõttu ei saanud kõiki algselt kogutud proove hilisemates analüüsides kasutada. Et tulevikus spetsiifilisuse määramist lihtsustada, võiks juba proovide kogumise ajal pöörata erilist tähelepanu kindla

peremeestaime väljaselgitamisele. See kindlustaks rohkem detailsemaid andmeid ja analüüsil tuleks arvestada ka negatiivseid vaatlusi, mille puhul ühtegi liiki peremeestaimelt ei leitud. Peremeestaime spetsiifilisemaks määramiseks saaks kasutada mükoriisaproovidel taimespetsiifilisi praimereid.

Liikide identifitseerimisel eristus perekonnast *Hymenogaster* 14 erinevat liiki. Fisheri täpse testi tulemusena kerkisid statistiliselt olulistena esile kolm *Hymenogaster* perekonna liiki: *H. citrinus*, *H. griseus* ja *H. arenarius*. Liiki *H. citrinus* esines küll ka perekondade *Salix* ja *Corylus* aladel, aga selgelt esines neid kõige rohkem perekonnaga *Quercus*. *H. griseus* oli kõige laiema peremeesteringiga seen, mis esines kõikide perekondade aladel. Sellegipoolest esines liiki *H. griseus* märkimisväärselt sagedamini perekonna *Salix* aladel. Liigil *H. arenarius* oli samuti suurem peremeestering, esinedes aladel perekondadega *Quercus*, *Tilia*, *Corylus*, *Populus*, mille seas esines seeneliiki kõige sagedamini *Tilia* perekonna aladel. Nende andmete põhjal võib küll oletada liikide poolt teatud eelistusi kindlate peremees-puude perekondadele, kuid erilist peremehespetsiifilisust seeneliikide seas täheldada ei saa. Liikidel nr. 2, nr. 3, nr. 4, nr. 5 puudusid andmebaasist liiginimedega vasted. Nimetute *Hymenogaster* perekonna liikide esinemine ainult *Salix* perekonna aladel võib viidata uute ja unikaalsete liikide olemasolule proovivõtmise piirkonnas, mis võivad omada rangemat peremehespetsiifilisust. Selle tõestamine nõuab aga rohkemate proovide võtmist antud piirkonnast ja üritada viljakeha morfoloogia põhjal määrata nende liigid.

Elaphomyces perekonna seas osutusid statistiliselt olulisteks liigid *E. asperulus* ja *E. papillatus*. Liik *E. asperulus* on kõige laiema peremeesteringiga käesoleva töö *Elaphomyces* perekonna liikidest, ent esines sagedamini okaspuude seas ja oluliselt sagedamini perekonna *Pinus* aladel. Väga huvitavaks osutus liik *E. papillatus*, mida leidis ainult perekonna *Populus* aladel erinevalt teistest sama perekonna liikidest, mis esinesid suuremal osal okaspuude või segametsa aladel. Ka *Elaphomyces* liikide seas ei esinenud ranget peremehespetsiifilisust. Erandiks võib lugeda ainult liigi *E. papillatus*, mida leidis ainult *Populus* aladel, kuid liigi vaatluste arv on väike ja spetsiifilisuse tõestamine vajab rohkem proove ning edasisi uuringuid. Perekondade *Tilia*, *Corylus*, *Salix* ja *Alnus* puhastes puistutes *Elaphomyces* perekonna liike ei leidunudki.

Antud töö tulemused peegeldasid üldiselt levinud arusaama ektomükoriisaseente peremehespetsiifilisusest, mis on suuremal osal liikidel üsna madal ja väljendub rohkem kindlate peremees-puude perekondade eelistustes (Smith ja Read, 2008). Sellegipoolest oli mõlemas perekonnas erandeid, mille edasisel uurimisel võib täheldada rangemat spetsiifilisust kindlate perekondade poole.

Sato, Yumoto ja Murakami (2007) uuringus analüüsiti perekonna *Strabilomyces* seente tuumset ja mitokondrilist DNA-d, et leida krüptilisi liike. Lisaks sellele identifitseeriti peremeestaimi analüüsides seente ja taimede DNA järjestusi, mis esinesid mükoriisas. Eesmärgiks oli leida krüptilised liigid, millel esineks kitsas peremehespetsiifilisus, mis viitaks sellele, et on alahinnatud liigispetsiifilisust ektomükoriisaste seente puhul. Tulemused viitasid sellele, et lai peremeestering ei pruugi olla nii tavaline, kui varem arvatud ja liikide siseselt võivad esineda mitmed krüptilised liigid, mis on kitsama spetsiifilisusega.

Ishida, Nara ja Hogetsu (2007) töös uuriti peremehespetsiifilisuse efekti ektomükoriisaseente kooslustele kindlal alal. Võrreldi koosluseid, mis olid seotud kaheksa kodominantse puuliigiga: *Abies homolepis* ja *Tsuga sieboldii* (*Pinaceae* sugukond), *Betula maximowicziana*, *Betula grossa* ja *Carpinus japonica* (*Betulaceae* sugukond) ning *Fagus crenata*, *Fagus japonica* ja *Quercus crispula* (*Fagaceae* sugukond). Uurimus viidi läbi Kesk-Jaapanis kahes segametsas. 55-st Ektomükoriisaseene liigist näitasid kaheksa märkimisväärset tendentsi spetsiifilisuse suunal. Täheldati kitsamat peremehespetsiifilisust perekonna ja sugukonna seas, mis võib olla aga põhjustatud statistiliste testide võimsuse erinevustes.

Tedersoo ja kollegide (2007) töö eesmärgiks oli dokumenteerida Seišellidel maapealset ja maa-alust ektomükoriisaseente mitmekesisust liikidel *Intsia bijuga*, *Vateriaopsis seychellarum*, *Eucalyptus robusta* ja *Pinus caribea*. Kasutades molekulaarse järjestuse andmeid näidati, et kohalikkudel liikide ektomükoriisa kooslused on liigivaesed ja kattuvad võõrliigi *E. robusta*, kuid mitte *P. caribea* sümbiontidega. Uuringus ei täheldatud liikidel erilist eelistust peremeestaimedele, mis viitab kitsama spetsiifilisusega seente haruldusele Seišellidel. Võrreldes teiste troopiliste ja parasvöötme ökosüsteemidega on kooslused liigivaesed. Seda põhjustab tõenäoliselt väike peremeestaimede populatsiooni suurus ja pikaajaline isolatsioon.

Tedersoo *et al.* (2008) uurisid enda töös Tasmaania parasvöötme vihmametsade ektomükoriisete seente koosluse liigirikkust ja peremehespetsiifilisuse puudumist. Lisaks taheti leida peremeestaimede ja nende läheduse mõju ektomükoriisaseente kooslusele. Liikide *Eucalyptus regnans* (Myrtaceae), *Pomaderris apetala* (Rhamnaceae) ja *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae) juuretippudelt leiti kokku 123 liiki ektomükoriisseid seeni. Märkimisväärselt näitas 66% seeneliikidest statistiliselt olulist peremehe eelistust, kuid kitsast peremehespetsiifilisust esines kõige sagedamate liikide (*Cortinarius*, *Tomentella*, *Thelephora*, *Russula*, *Lactarius*, *Clavulina*, *Descolea*) seas vähe. Uuring sarnanes Ishida, Nara ja Hogetsu (2007) tööga, mis näitas Jaapani segametsas peremehe eelistust 15% liikidest.

7. Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli anda ülevaade ektomükoriisa seente peremehespetsiifilisusest ja hinnata spetsiifilisust seeneperekondades *Hymenogaster* ja *Elaphomyces*. Peremehespetsiifilisuse hindamiseks olid kasutada andmed Eestist ja Põhja-Lätist kogutud proovidest. Statistilise analüüsi tulemusena näitasid osad liigid teatud eelistust, kuid mitte ranget spetsiifilisust kindlate peremeestaimede perekondade suhtes.

Statistiliste meetodite alusel sai *Hymenogaster* perekonnast välja tuua liigid *H. citrinus*, *H. griseus* ja *H. arenarius*, mis esinesid küll koos mitme perekonnaga, kuid kõik omasid siiski teatud eelistust erinevate peremeeste perekondade suhtes. Huvitavaks erandiks olid nimetud liigid, mis esinesid ainult *Salix* perekonna aladel.

Elaphomyces perekonna liigid eelistasid selgelt okaspuid perekondadest *Picea* ja *Pinus*. Liigi *E. asperulus* puhul sai täheldada peremehespetsiifilisust *Pinus* perekonna puudele. Perekonna teistest liikidest erines *E. papillatus*, mida leiti ainult perekonna *Populus* aladelt ning sellest lähtuvalt saab järeldada, et see võib viidata rängele peremehespetsiifilisusele.

Ektomükoriisete seente peremehespetsiifilisusel on oluline roll seente elus, mõjutades selle erinevaid aspekte. Peremehespetsiifilisus ja selle mehhanismid on liikide tasemel veel suuresti uurimata, kuid oletatakse, et see võib olla kitsam, kui varem arvatud. Spetsiifilisust on rohkem uuritud põhjapoolkera majanduslikult tähtsate puuperekondade ja seeneperekondade juures.

Molekulaarsete meetodite ja uute tehnikate kasutuselevõtt on antud valdkonnas märkimisväärselt lihtsustanud liikide ja nende peremeeste tuvastamisprotsessi ning sealhulgas andnud detailsemaid andmeid ektomükorriisete seente liikide, peremeestaimede ja geograafilise leviku kohta. Ektomükorriisete seente leviku ja mõju tõttu erinevate metsade ökosüsteemides on nende uurimine keskkonnale ja seal toimuvatele protsessidele väga oluline.

8. Summary

The aim of the this study was to give an overview of host specificity in ectomycorrhizal fungi and to evaluate the host specificity in genera *Hymenogaster* and *Elaphomyces*. The samples for host specificity evaluation were gathered from Estonia and North-Latvia. Statistical analyses showed some preference among species, but not strict specificity towards certain host genera.

Species *Hymenogaster citrinus*, *H. griseus* and *H. arenarius* had a certain preference towards different host genera. The interesting exceptions were unnamed species, which occurred only in areas with genus *Salix*.

Elaphomyces genus species clearly preferred coniferous trees from genera *Picea* and *Pinus*. *E. asperulus* had a noticeable specificity towards genus *Pinus*. *E. papillatus* differed from other species from genus *Elaphomyces*, as the species was only found on areas with genus *Populus* and this might refer to exclusive host specificity.

Host specificity of ectomycorrhizal fungi has an essential role in the lives of fungi, as it affects different aspects of it. Host specificity and its mechanisms have not been thoroughly studied amongst species level, but it is assumed to be more narrow than thought before. Specificity has been studied further on northern hemisphere amongst economically more important tree and fungal genera.

New molecular methods and techniques have remarkably simplified and made more accurate the identification of species of fungi and their hosts. These developments have also given more detailed data on fungal species, hosts and their geographical distribution. Research

into ectomycorrhizal fungi is important to environment and its processes because of its distribution and impact in different kinds of forest ecosystems.

9. Tänuavaldused

Tänan siiralt juhendaja Leho Tedersood.

Samuti tänan meeskonda välitöödel ja laboris.

10. Kasutatud kirjandus

Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., Pennanen, T. and Sen, R., 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186(2), pp.281-285.

Anderson, I.C. and Cairney, J.W., 2007. Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp.388-406.

Andrew, C. and Lilleskov, E.A., 2009. Productivity and community structure of ectomycorrhizal fungal sporocarps under increased atmospheric CO₂ and O₃. *Ecology Letters*, 12(8), pp.813-822.

Anslan, S. and Tedersoo, L., 2015. Performance of cytochrome c oxidase subunit I (COI), ribosomal DNA Large Subunit (LSU) and Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in DNA barcoding of *Collembola*. *European Journal of Soil Biology*, 69, pp.1-7.

Baar, J. and Ter Braak, C. J. F., 1996. Ectomycorrhizal sporocarp occurrence as affected by manipulation of litter and humus layers in Scots pine stands of different age. *Applied Soil Ecology*, 4(1), pp.61-73.

Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U. and Tedersoo, L., 2011. A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS

genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(2), pp.313-320.

Berbee, M.L. and Taylor, J.W., 2010. Dating the molecular clock in fungi—how close are we?. *Fungal Biology Reviews*, 24(1), pp.1-16.

Blackwell, M., 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3), pp.426-438.

Brundrett, M., 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), pp.473-495.

Bruns, T.D., Bidartondo, M.I. and Taylor, D.L., 2002. Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us?. *Integrative and Comparative Biology*, 42(2), pp.352-359.

Cheevadhanarak, S. and Ratchadawong, S., 2006. Diversity of ectomycorrhizal fungi on *Dipterocarpaceae* in Thailand. *Journal of Biological Sciences*, 6(6), pp.1059-1064.

Claridge, A.W., Cork, S.J. and Trappe, J.M., 2000 (a). Diversity and habitat relationships of hypogeous fungi. I. Study design, sampling techniques and general survey results. *Biodiversity & Conservation*, 9(2), pp.151-173.

Claridge, A.W., Barry, S.C., Cork, S.J. and Trappe, J.M., 2000 (b). Diversity and habitat relationships of hypogeous fungi. II. Factors influencing the occurrence and number of taxa. *Biodiversity & Conservation*, 9(2), pp.175-199.

Castellano, M.A., Beever, R.E. and Trappe, J.M., 2012. Sequestrate fungi of New Zealand: *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales, Elaphomycetaceae). *New Zealand Journal of Botany*, 50(4), pp.423-433.

Castellano, M.A., Trappe, J.M. and Vernes, K., 2011. Australian species of *Elaphomyces* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota). *Australian Systematic Botany*, 24(1), pp.32-57.

Comandini, O., Rinaldi, A.C. and Kuyper, T.W., 2012. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. *M. Pagano. Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments. Nova Science Publishers. Nueva York. p*, pp.165-200.

Courty, P.E., Buée, M., Diedhiou, A.G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.P., Uroz, S. and Garbaye, J., 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), pp.679-698.

Courty, P.E., Franc, A., Pierrat, J.C. and Garbaye, J., 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), pp.5792-5801.

Cox, F., Barsoum, N., Lilleskov, E.A. and Bidartondo, M.I., 2010. Nitrogen availability is a primary determinant of conifer mycorrhizas across complex environmental gradients. *Ecology Letters*, 13(9), pp.1103-1113.

De Roman, M., Claveria, V. and De Miguel, A.M., 2005. A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycological Research*, 109(10), pp.1063-1104.

Dickie, I.A. and FitzJohn, R.G., 2007. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17(4), pp.259-270.

Diédhiou, A.G., Selosse, M.A., Galiana, A., Diabaté, M., Dreyfus, B., Bâ, A.M., De Faria, S.M. and Béna, G., 2010. Multi- host ectomycorrhizal fungi are predominant in a Guinean tropical rainforest and shared between canopy trees and seedlings. *Environmental Microbiology*, 12(8), pp.2219-2232.

Egger, K.N., 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), pp.1415-1422.

Egger, K.N., 1996. Molecular systematics of E-strain mycorrhizal fungi: Wilcoxina and its relationship to *Tricharina* (Pezizales). *Canadian Journal of Botany*, 74(5), pp.773-779.

Finlay, R.D., 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), pp.1115-1126.

Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D. and Taylor, J.W., 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 69(1), pp.180-190.

He, X.H., Critchley, C. and Bledsoe, C., 2003. Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(6), pp.531-567.

Horton, T.R. and Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Molecular Ecology*, 10(8), pp.1855-1871.

Ishida, T.A., Nara, K. and Hogetsu, T., 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer–broadleaf forests. *New Phytologist*, 174(2), pp.430-440.

Jones, M.D., Durall, D.M. and Cairney, J.W., 2003. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist*, 157(3), pp.399-422.

Kagan-Zur, V., Freeman, S., Luzzati, Y., Roth-Bejerano, N. and Shabi, E., 2001. Survival of introduced *Tuber melanosporum* at two sites in Israel as measured by occurrence of mycorrhizas. *Plant and soil*, 229(2), pp.159-166.

Kennedy, P.G., Peay, K.G. and Bruns, T.D., 2009. Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: are priority effects a rule or an exception?. *Ecology*, 90(8), pp.2098-2107.

Kennedy, P., 2010. Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist*, 187(4), pp.895-910.

Kernaghan, G., Widden, P., Bergeron, Y., Légaré, S. and Paré, D., 2003. Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed woods. *Oikos*, 102(3), pp.497-504.

Kõljalg, U., Dahlberg, A., Taylor, A.F.S., Larsson, E., Hallenberg, N., Stenlid, J., Larsson, K.H., Fransson, P.M., Kårén, O. and Jonsson, L., 2000. Diversity and abundance of resupinate thelephoroid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. *Molecular Ecology*, 9(12), pp.1985-1996.

Kõljalg, U., Tammi, H., Timonen, S., Agerer, R. and Sen, R., 2002. ITS rDNA sequence-based phylogenetic analysis of Tomentellopsis species from boreal and temperate forests, and the identification of pink-type ectomycorrhizas. *Mycological Progress*, 1(1), pp.81-92.

LePage, B., Currah, R., Stockey, R. and Rothwell, G., 1997. Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. *American Journal of Botany*, 84(3), pp.410-410.

Morris, M.H., Pérez-Pérez, M.A., Smith, M.E. and Bledsoe, C.S., 2009. Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus spp.*) in a tropical cloud forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2), pp.274-287.

Parrent, J.L., Morris, W.F. and Vilgalys, R., 2006. CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecology*, 87(9), pp.2278-2287.

Peay, K.G., Garbelotto, M. and Bruns, T.D., 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, 91(12), pp.3631-3640.

Pringle, A., Bever, J.D., Gardes, M., Parrent, J.L., Rillig, M.C. and Klironomos, J.N., 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, pp.699-715.

Roy, M., Rochet, J., Manzi, S., Jargeat, P., Gryta, H., Moreau, P.A. and Gardes, M., 2013. What determines *Alnus* associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale. *New Phytologist*, 198(4), pp.1228-1238.

Sato, H., Yumoto, T. and Murakami, N., 2007. Cryptic species and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Strobilomyces* (*Strobilomycetaceae*). *American Journal of Botany*, 94(10), pp.1630-1641.

Smith, M.E., Henkel, T.W., Catherine Aime, M., Fremier, A.K. and Vilgalys, R., 2011. Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co- occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytologist*, 192(3), pp.699-712.

Smith, S.E. and Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd. Academic Press: Elsevier.

Sirikantaramas, S., Sugioka, N., Lee, S.S., Mohamed, L.A., Lee, H.S., Szmidt, A.E. and Yamazaki, T., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal fungi associated with *Dipterocarpaceae*. *Tropics*, 13(2), pp.69-77.

Stielow, B., Bratek, Z., Orczán, A.K.I., Rudnoy, S., Hensel, G., Hoffmann, P., Klenk, H.P. and Göker, M., 2011. Species delimitation in taxonomically difficult fungi: the case of *Hymenogaster*. *PLoS One*, 6(1), p.e15614.

Suvi, T., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Beaver, K., Gerlach, J. and Koljalg, U., 2010. Mycorrhizal symbionts of *Pisonia grandis* and *P. sechellarum* in Seychelles: identification of mycorrhizal fungi and description of new *Tomentella* species. *Mycologia*, 102(3), pp.522-533.

Suz, L.M., Barsoum, N., Benham, S., Dietrich, H.P., Fetzner, K.D., Fischer, R., García, P., Gehrman, J., Kristöfel, F., Manninger, M. and Neagu, S., 2014. Environmental drivers of ectomycorrhizal communities in Europe's temperate oak forests. *Molecular Ecology*, 23(22), pp.5628-5644.

Suz, L.M., Martín, M.P. and Colinas, C., 2006. Detection of *Tuber melanosporum* DNA in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), pp.251-257.

Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M.B., Burgess, R. and Baldrian, P., 2012. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), pp.735-746.

Talbot, J.M., Bruns, T.D., Smith, D.P., Branco, S., Glassman, S.I., Erlandson, S., Vilgalys, R. and Peay, K.G., 2013. Independent roles of ectomycorrhizal and saprotrophic communities in soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, pp.282-291.

Taylor, A.F.S., 2008. Recent advances in our understanding of fungal ecology. *Coolia*, 51(4), pp.197-212.

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A. and Smith, M.E., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213), p.1256688.

Tedersoo, L., Bahram, M., Jairus, T., Bechem, E., Chinoya, S., Mpumba, R., Leal, M., Randrianjohany, E., Razafimandimbison, S., Sadam, A. and Naadel, T., 2011. Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. *Molecular Ecology*, 20(14), pp.3071-3080.

Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diedhiou, A.G., Henkel, T.W., Kjølner, R., Morris, M.H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K.G. and Põlme, S., 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21(17), pp.4160-4170.

Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B.M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I. and Kõljalg, U., 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist*, 180(2), pp.479-490.

Tedersoo, L., May, T.W. and Smith, M.E., 2010 (a). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), pp.217-263.

Tedersoo, L. and Nara, K., 2010. General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 185(2), pp.351-354.

Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G. and Kõljalg, U., 2010 (b). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist*, 188(1), pp.291-301.

Tedersoo, L., Sadam, A., Zambrano, M., Valencia, R. and Bahram, M., 2010 (c). Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME Journal*, 4(4), pp.465-471.

Tedersoo, L. and Smith, M.E., 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews*, 27(3), pp.83-99.

Tedersoo, L., Suvi, T., Beaver, K. and Kõljalg, U., 2007. Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (*Dipterocarpaceae*) and *Intsia bijuga* (*Caesalpinaceae*) to the introduced *Eucalyptus robusta* (*Myrtaceae*), but not *Pinus caribea* (*Pinaceae*). *New Phytologist*, 175(2), pp.321-333.

Toju, H., Sato, H., Yamamoto, S., Kadowaki, K., Tanabe, A.S., Yazawa, S., Nishimura, O. and Agata, K., 2013. How are plant and fungal communities linked to each other in belowground ecosystems? A massively parallel pyrosequencing analysis of the association specificity of root-associated fungi and their host plants. *Ecology and Evolution*, 3(9), pp.3112-3124.

Toljander, J.F., Eberhardt, U., Toljander, Y.K., Paul, L.R. and Taylor, A.F., 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist*, 170(4), pp.873-884.

Van Der Heijden, M.G. and Horton, T.R., 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*, 97(6), pp.1139-1150.

Vrålstad, T., Fossheim, T. and Schumacher, T., 2000. *Piceirhiza bicolorata*—the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate?. *New Phytologist*, 145(3), pp.549-563.

Walker, J.K., Cohen, H., Higgins, L.M. and Kennedy, P.G., 2014. Testing the link between community structure and function for ectomycorrhizal fungi involved in a global tripartite symbiosis. *New Phytologist*, 202(1), pp.287-296.

Wang, B. and Qiu, Y.L., 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), pp.299-363.

11. Lisad

Lisa 1 Tabel 1: Perekonna *Hymenogaster* leitud liikide proovide ja alade arv

	<i>Salix</i>		<i>Quercus</i>		<i>Tilia</i>		<i>Corylus</i>		<i>Fagus</i>		<i>Populus</i>			
	proovid	alad	proovid	alad	proovid	alad	proovid	alad	proovid	alad	proovid	alad	proovid kokku	alad kokku
<i>Hymenogaster intermedius</i>					1	1	5	4					6	5
<i>Hymenogaster citrinus</i>	1	1	5	5			1	1					7	7
<i>Hymenogaster huthii</i>							1	1	1	1			2	2
<i>Hymenogaster megasporus</i>	2	2											2	2
<i>Hymenogaster griseus</i>	11	8	2	2	1	1	1	1	1	1	4	3	20	16
<i>Hymenogaster tener</i>			1	1			1	1					2	2
<i>Hymenogaster arenarius</i>			1	1	7	7	4	4			1	1	13	13
<i>Hymenogaster vulgaris</i>	1	1	1	1									2	2
<i>Hymenogaster niveus</i>					2	1							2	1
<i>Hymenogaster 1</i>	1	1			1	1	1	1	2	2			5	5
<i>Hymenogaster 2</i>	3	1											3	1
<i>Hymenogaster 3</i>	2	1											2	1
<i>Hymenogaster 4</i>	1	1											1	1
<i>Hymenogaster 5</i>	1	1											1	1
kokku:	23	17	10	10	12	11	14	13	4	4	5	4	68	59

Lisa 2 Tabel 2: Fisheri täpses testis kasutatud perekonna *Hymenogaster* liikide arv ja statistiline olulisus

	<i>Salix</i>	<i>Quercus</i>	<i>Tilia</i>	<i>Corylus</i>	<i>Fagus</i>	<i>Populus</i>	Alad kokku	Statistiline olulisus
<i>Hymenogaster intermedius</i>			1	4			5	p = 0.103
<i>Hymenogaster citrinus</i>	1	5		1			7	p = 0.022
<i>Hymenogaster huthii</i>				1	1		2	p = 0.340
<i>Hymenogaster megasporus</i>	2						2	p = 0.449
<i>Hymenogaster griseus</i>	8	2	1	1	1	3	16	p = 0.007
<i>Hymenogaster tener</i>		1		1			2	p = 0.882
<i>Hymenogaster arenarius</i>		1	7	4		1	13	p = 0.002
<i>Hymenogaster vulgaris</i>	1	1					2	p = 0.882
<i>Hymenogaster nr.1</i>	1		1	1	2		5	p = 0.165
kokku:	13	13	10	10	13	4	54	

Lisa 3 Tabel 3: Perekonna *Elaphomyces* leitud liikide proovide ja alade arv

	<i>Picea</i>		<i>Pinus</i>		<i>Populus</i>		proovid kokku	alad kokku
	proovid	alad	proovid	alad	proovid	alad		
<i>Elaphomyces asperulus</i>	8	4	11	5	2	2	21	11
<i>Elaphomyces sp. 7381.2</i>	6	3					6	3
<i>Elaphomyces sp. 1 EL-2015</i>	2	1					2	1
<i>Elaphomyces 1</i>	8	3					8	3
<i>Elaphomyces muricatus</i>	4	3					4	3
<i>Elaphomyces sp. 2 EL-2015</i>	1	1					1	1
<i>Elaphomyces papillatus</i>					2	2	2	2
kokku:	29	15	11	5	4	4	44	24

Lisa 4 Tabel 4: Fisheri täpses testis kasutatud perekonna *Elaphomyces* liikide arv ja statistiline olulisus

	<i>Picea</i>	<i>Pinus</i>	<i>Populus</i>	Alad kokku	Statistiline olulisus
<i>Elaphomyces asperulus</i>	4	5	2	11	p = 0.025
<i>Elaphomyces sp. 7381.2</i>	3			3	p = 0.544
<i>Elaphomyces l</i>	3			3	p = 0.544
<i>Elaphomyces muricatus</i>	3			3	p = 0.544
<i>Elaphomyces papillatus</i>			2	2	p = 0.026
kokku:	13	5	4	22	

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aro Nurkse,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Peremehespetsiifilisus ektomükoriisaseentel, sealhulgas perekondades Hymenogaster ja Elaphomyces,

mille juhendaja on Leho Tedersoo

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartu, 19.05.2016